

# CELL CULTURE SOLUTION, METHOD FOR CULTURING CELL AND BIOASSAY METHOD

**Patent number:** JP2001299334  
**Publication date:** 2001-10-30  
**Inventor:** WATANABE YOSHIKI  
**Applicant:** SUMITOMO BAKELITE CO LTD  
**Classification:**  
- **International:** C12N5/02; C12Q1/04  
- **European:**  
**Application number:** JP20000118958 20000420

## Abstract of JP2001299334

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a culture solution for stably culturing neurocytes.  
**SOLUTION:** This culture solution for the neurocytes is obtained by formulating a Dulbecco-modified MEM culture solution (DMEM) and an F-12 culture solution as a base with insulin, a transferrin, selenious acid, albumin, superoxide dismutase, catalase, glutamic acid and cysteine.

---

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号  
特開2001-299334  
(P2001-299334A)

(43)公開日 平成13年10月30日(2001. 10. 30)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームト <sup>*</sup> (参考)
C 1 2 N 5/02		C 1 2 N 5/02	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/04		C 1 2 Q 1/04	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 3 頁)

(21)出願番号 特願2000-118958(P2000-118958)

(22)出願日 平成12年4月20日(2000. 4. 20)

(71)出願人 000002141

住友ベークライト株式会社

東京都品川区東品川2丁目5番8号

(72)発明者 渡辺 芳明

秋田市土崎港相築町字中島下27-4 秋田

住友ベーク株式会社内

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ02 QR02 QR48

QR49 QR50 QR69

4B065 AA90X BB02 BB19 BB21

CA46

(54)【発明の名称】 細胞培養液、細胞培養方法及びバイオアッセイ方法

(57)【要約】

【課題】 神経細胞を安定に培養するための培養液及びその培養方法を提供する。

【解決手段】 D M E M と F - 1 2 培養液をベースとし、インシュリン、トランスフェリン、亜セレン酸、アルブミン、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、グルタミン酸、システインを配合した神経細胞用培養液。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 インシュリン、トランスフェリン、亜セレン酸、アルブミン、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、0.005～0.05mMのグルタミン酸、及び0.02～2mMのシステインを少なくとも含むことを特徴とする細胞培養液

【請求項2】  $\alpha$ -トコフェロールまたはその誘導体を含む請求項1記載の細胞培養液。

【請求項3】 ダルベッコ改変MEM培養液とハムのF-12培養液の比率が1対1から20対1である請求項1又は2記載の細胞培養液。

【請求項4】 請求項1～3記載のいずれかの培養液を用いることを特徴とする細胞培養方法。

【請求項5】 請求項4記載の細胞培養方法を用いることを特徴とするバイオアッセイ方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は神経細胞の培養に関わる技術であり、さらに詳しくは、その培養液、培養方法であり、これを用いた生物試験法は、神経科学、神経生物学、神経化学等の細胞レベルの研究に、またはその応用である医薬品の開発等に関連するものである。

## 【0002】

【従来の技術】神経細胞の培養は、アルツハイマー病などの脳神経性疾患の治療薬の開発等に限らず、神経細胞の働きを研究する上で、欠くことのできない技術となっている。神経細胞の初代培養は、株化した細胞を用いる場合に比べ、安定した培養が難しい等の問題がある。この点を改良し安定な薬理試験にも耐え得るような培養系を作り出すべく、種々の試みがなされてきた。現在普通に用いられる培養液としてはMEM、ダルベッコ改変MEM培養液(DMEM)ハムのF-12培養液(F-12)等がある。培養液に加える栄養成分から成る添加物として、BottensteinらのN2添加物、[Proceeding of National Academy of Science, U.S.A. 76:514(1979)]やBrewerらのB27添加物[Brain Research 65:494(1989)他]がある。これらは、インシュリン、トランスフェリンなどの栄養因子やビタミン類を配合したものである。またグリア細胞の培養上清を含有する神経細胞用培養液(特開平9-289891号公報、特開平9-322765号公報)も報告されている。これらは全て、種々の成分を配合し、神経細胞の安定した培養を目指したものである。

【0003】この方向とは逆に、神経細胞に与える種々の因子や化学物質が与える影響や効果を調べる目的では培養液中に配合される成分は可能な限り少ない方が良く、披検物質の影響がマスクされるようでは都合が悪い場合もある。このような観点から、成分を規定した培養液としては、MEM培養液やDMEM/F-12培養液にN2添加物を加えたものが最少の栄養成分添加培養液として、よく用いられてきた。しかし、培養安定性が低

すぎる点が問題となり、これを避ける目的で、血清添加培養液をまず使用し、次に血清を抜いた培養液に変える方法が取られている。これに代わることのできる、少ない成分からなり、安定した培養が可能な培養液で満足できるものは存在しなかった。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明者は、これらの問題点を比較検討し、栄養成分の絞り込みや、アミノ酸の必要度を検討し安定な培養系を構成できる処方としての本発明に至ったもので、以下に示す培養液処方と培養方法等を提供することを目的とする。

## 【0005】

【問題を解決するための手段】即ち本発明の第一の発明は、(1)インシュリン、トランスフェリン、亜セレン酸、アルブミン、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、0.005～0.05mMのグルタミン酸、及び0.02～2mMのシステインを少なくとも含むことを特徴とする細胞細胞培養液であり、第2の発明は、第一の発明の培養液を用いる細胞の培養方法であり、さらに第3の発明は、第2の発明の細胞培養方法を用いるバイオアッセイ方法である。

## 【0006】

【発明の実施形態】培養液は通常の方法で調製が可能である。例えば予め調製した培養液に、以下の成分を添加調製する方法などがある。培養液に含有される各成分の好ましい濃度は、インシュリン1～100 $\mu$ g/mL、トランスフェリン1～100 $\mu$ g/mL、亜セレン酸1～100ng/mL、アルブミン0.5～2.5mg/mL、スーパーオキシドジスムターゼ1～100 $\mu$ g/mL、カタラーゼ1～100 $\mu$ g/mL、グルタミン酸0.005～0.05mM、システインまたはその誘導体0.02～2mMである。また、アスパラギン酸もグルタミン酸と同様に過剰興奮毒性を示す場合があり、グルタミン酸と同様の濃度が好ましい。

【0007】また、高い濃度のシステインは神経細胞に対して毒性を示すことが報告されている[Science 4:248(1990)、Brain Research 24:705(1995)]が、本発明の濃度処方では神経細胞の培養に好適な効果を示す。Neuroscience Letter 259:79(1999)では、細胞内グルタチオンを増加させる効果は示されているものの、生存維持に対する効果は5%程しかないことが報告されている。しかし、本発明の処方では、後述するように生存維持効果が大きく認められるものである。

【0008】培養液には、さらに $\alpha$ -トコフェロールや、酢酸トコフェロールなどの誘導体を配合することが安定培養には好ましい。抗酸化作用のあるグルタチオンやN-アセチルシステインなどの配合も効果を示すことが報告されている[The Journal of Neuroscience 15:2857(1995)、The Journal of Biological Chemistry 45:26827(1995)、Journal of Neuropharmacology 35:571(1996)]。

【0009】基本となる培養液は、DMEMとF-12培養液が適しており、その配合比は1対1から20対1の範囲が好ましい。より限定した配合となるMEMなども用いることが可能であるし、同様類似の配合処方培養液も使用可能である。

【0010】これらの培養液を用いた神経細胞の培養系は、種々の神経栄養作用、神経保護作用、神経毒性作用などの薬剤の研究に好適な試験系となる。例えば、BDNF（脳由来神経栄養因子）などの神経保護作用のある薬剤や、カイニン酸などの神経毒性を示す薬剤などの、試験評価系に使用することができる。

【0011】培養する神経細胞は通常の方法で調製すればよく、特に限定されるものではない。一般的に胎児の神経細胞の方が生後の細胞よりも好適である。培養方法の種類としては、分散培養、器官培養、再凝集培養などいずれでも可能で、特に限定されるものではない。

【0012】

【実施例】以下、本発明を実施例にもとづき説明する。

（実施例1）DMEM、F-12液（SIGMA社製）を10：1の比率とした培養液を調製。インシュリンを5 $\mu$ g/mL、トランスフェリンを5 $\mu$ g/mL、亜セレン酸を5ng/mL（以上BD社製）、アルブミンを2.5mg/mL、システインを0.5mM、グルタミン酸を0.01mM、 $\alpha$ -トコフェロール酢酸エステルを5 $\mu$ g/mL、スーパーオキシジスムターゼを1 $\mu$ g/mL（7.5U/mL）、カタラーゼを1 $\mu$ g/mL（以上SIGMA社製）に添加調製した。

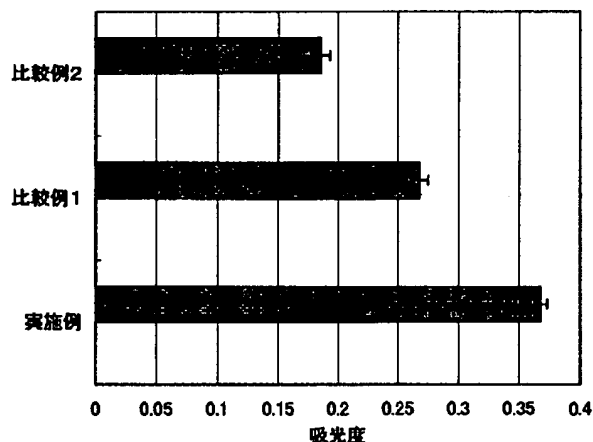
【0013】（比較例1、2）比較例1として、基本となる培養液をDMEMとし、インシュリンを5 $\mu$ g/mL、トランスフェリンを5 $\mu$ g/mL、亜セレン酸を5ng/mL（以上BD社製）、アルブミンを2.5mg/mL、システインを0mM、グルタミン酸を0mM、 $\alpha$ -トコフェロール酢酸エステルを5 $\mu$ g/mL、スーパーオキシジスムターゼを1 $\mu$ g/mL

（7.5U/mL）、カタラーゼを1 $\mu$ g/mL（以上SIGMA社製）の培養液を調製した。比較例2として、DMEM、F-12液を10：1の比率とした培養液を調製。インシュリンを5 $\mu$ g/mL、トランスフェリンを5 $\mu$ g/mL、亜セレン酸を5ng/mL（以上BD社製）、アルブミンを2.5mg/mL、システインを2.5mM、グルタミン酸を0.01mM、 $\alpha$ -トコフェロール酢酸エステルを5 $\mu$ g/mL、スーパーオキシジスムターゼを1 $\mu$ g/mL（7.5U/mL）、カタラーゼを1 $\mu$ g/mL（以上SIGMA社製）に添加調製した。

【0014】（実施例、比較例の培養試験）神経細胞はwistar系ラットの胎児（胎生17日）の脳を神経細胞分散液（住友ベークライト社製）により、その規定された方法で分散調製した。2.5 $\times 10^6$  cells/mLに調製した細胞液をポリ-L-リジン（SIGMA社製）をコートした48ウェルプレートに200 $\mu$ L/ウェル加え、炭酸ガスインキュベーター中で5日間培養した。顕微鏡下培養形態を観察したところ、実施例1の培養液では良好な神経突起の伸長が認められた。比較例1、比較例2の培養液では実施例の培養液に比し突起の伸長等が劣っていた。次にハンクス液で2回洗浄後、DMEM液にインシュリンを5 $\mu$ g/mL、トランスフェリンを5 $\mu$ g/mL、亜セレン酸を5ng/mL、MTT（SIGMA社製）を0.15mM加えた培養液に交換し2時間培養した。培養液を捨てDMSOを200 $\mu$ L/ウェル加え生成した色素を溶解、96ウェルプレート（住友ベークライト製）に150 $\mu$ L/ウェル量移し替えた。マルチプレート用分光光度計を用い、測定波長550nmで吸光度を測定した。結果は図1に示すとおり、実施例の培養液を用いた場合、数値が高く生存細胞数が多い。

【0015】

【図1】



【0016】

【発明の効果】本発明を用いることにより、安定な神経細胞培養系を得ることができ、細胞に与える薬剤の響評

価、各種因子の検討、細胞間相互作用の検討などが効果的に行える。